

24.11.2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

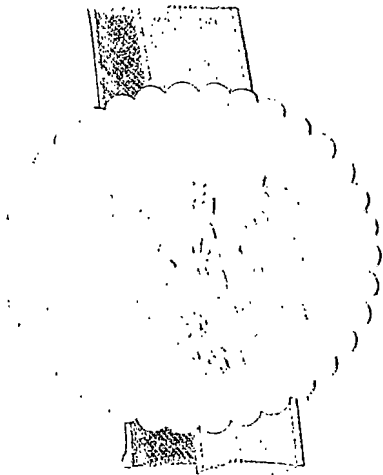
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 3 年 1 1 月 1 4 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 3 - 3 8 5 0 5 4  
Application Number:  
[ST. 10/C]:                      [ J P 2 0 0 3 - 3 8 5 0 5 4 ]

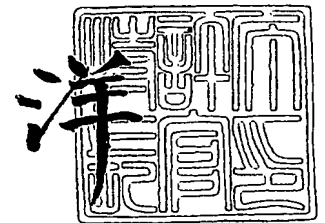
出      願      人                      中 外 製 薬 株 式 有 限 公 司  
Applicant(s):



2 0 0 5 年    1 月    6 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



出証番号    出証特 2 0 0 4 - 3 1 1 9 7 5 8

【書類名】 特許願  
【整理番号】 032396  
【提出日】 平成15年11月14日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A61K  
C08B

【発明者】  
【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内  
【氏名】 韓 世光

【発明者】  
【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内  
【氏名】 下房地 剛

【特許出願人】  
【識別番号】 000003311  
【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】  
【識別番号】 100089705  
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区  
ユアサハラ法律特許事務所

【弁理士】  
【氏名又は名称】 社本 一夫  
【電話番号】 03-3270-6641  
【ファクシミリ番号】 03-3246-0233

【選任した代理人】  
【識別番号】 100076691  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 増井 忠次

【選任した代理人】  
【識別番号】 100075270  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 小林 泰

【選任した代理人】  
【識別番号】 100080137  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 千葉 昭男

【選任した代理人】  
【識別番号】 100096013  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 富田 博行

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 051806  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 0107764

**【書類名】特許請求の範囲****【請求項 1】**

架橋多糖微粒子の製造方法であって、

- a) 架橋可能な官能基を有する多糖誘導体を含む希薄溶液を調製する工程；
- b) 当該溶液を微粒子状の液滴に分散する工程；および
- c) 当該液滴に含まれる溶液の濃縮により当該多糖誘導体の架橋反応を進行させる工程を含む前記製造方法。

**【請求項 2】**

架橋ヒアルロン酸微粒子の製造方法であって、

- a) 架橋可能な官能基を有するヒアルロン酸誘導体を含む希薄溶液を調製する工程；
- b) 当該溶液を微粒子状の液滴に分散する工程；および
- c) 当該液滴に含まれる溶液の濃縮により当該ヒアルロン酸誘導体の架橋反応を進行させる工程を含む前記製造方法。

**【請求項 3】**

前記工程 b) が、前記溶液を噴霧することにより微粒子状の液滴に分散する工程である、請求項 1 および 2 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

**【請求項 4】**

得られる微粒子の平均粒子径が  $0.01\mu\text{m} \sim 150\mu\text{m}$  である、請求項 1 および 2 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

**【請求項 5】**

得られる微粒子が薬物担体である、請求項 1 および 2 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

**【請求項 6】**

得られる微粒子が薬物徐放担体である、請求項 1 および 2 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

**【請求項 7】**

架橋反応前の希薄溶液が薬物を含み、当該薬物が架橋反応後に得られる微粒子中に担持されていることを特徴とする、請求項 1 および 2 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

**【請求項 8】**

前記架橋反応が、薬物共存下でも薬物を変性させない架橋方法である請求項 7 に記載の製造方法。

**【請求項 9】**

前記架橋可能な官能基がメルカプト基であり、前記架橋反応がジスルフィド結合形成により架橋を形成する反応である、請求項 1 および 2 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

**【請求項 10】**

前記架橋反応がメルカプト基と不飽和結合との間の付加反応により架橋を形成する反応である、請求項 1 および 2 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

**【請求項 11】**

前記架橋反応がヒドラジド基と活性カルボン酸エステルとの間の反応により架橋を形成する反応である、請求項 1 および 2 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

**【請求項 12】**

架橋多糖微粒子であって、

- a) 架橋可能な官能基を有する多糖誘導体を含む希薄溶液を調製する工程；
- b) 当該溶液を微粒子状の液滴に分散する工程；および
- c) 当該液滴に含まれる溶液の濃縮により当該多糖誘導体の架橋反応を進行させる工程を含む製造方法により調製することができる前記架橋多糖微粒子。

**【請求項 13】**

架橋ヒアルロン酸微粒子であって、

- a) 架橋可能な官能基を有するヒアルロン酸誘導体を含む希薄溶液を調製する工程；

b) 当該溶液を微粒子状の液滴に分散する工程；および  
c) 当該液滴に含まれる溶液の濃縮により当該ヒアルロン酸誘導体の架橋反応を進行させる工程  
を含む製造方法により調製することができる前記架橋ヒアルロン酸微粒子。

【請求項 14】

前記工程 b) が、前記溶液を噴霧することにより微粒子状の液滴に分散する工程である、請求項 12 および 13 のいずれか 1 項に記載の微粒子。

【請求項 15】

平均粒子径が、 $0.01\mu\text{m}$ ～ $150\mu\text{m}$ である請求項 12 および 13 のいずれか 1 項に記載の微粒子。

【請求項 16】

薬物担体である請求項 12 および 13 のいずれか 1 項に記載の微粒子。

【請求項 17】

薬物徐放担体である請求項 12 および 13 のいずれか 1 項に記載の微粒子。

【請求項 18】

架橋反応前の希薄溶液が薬物を含み、当該薬物が架橋反応後に得られる微粒子中に担持されている、請求項 12 および 13 のいずれか 1 項に記載の微粒子。

【請求項 19】

前記架橋反応が、薬物共存下でも薬物を変性させない架橋方法である請求項 18 に記載の微粒子。

【請求項 20】

前記架橋可能な官能基がメルカプト基であり、前記架橋反応がジスルフィド結合形成により架橋を形成する反応である、請求項 12 および 13 のいずれか 1 項に記載の微粒子。

【請求項 21】

前記架橋反応がメルカプト基と不飽和結合との間の付加反応により架橋を形成する反応である、請求項 12 および 13 のいずれか 1 項に記載の微粒子。

【請求項 22】

前記架橋反応がヒドラジド基と活性カルボン酸エステルとの間の反応により架橋を形成する反応である、請求項 12 および 13 のいずれか 1 項に記載の微粒子。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】架橋多糖微粒子およびその製造方法

## 【技術分野】

【0001】

本発明は、薬物、特に薬効を有するタンパク質またはペプチドを徐放する架橋多糖薬物徐放微粒子担体、及びその製造方法に関する。

## 【背景技術】

【0002】

近年、薬効を持つタンパク質、ペプチドの製剤が盛んに実用化されているが、一般にこうした薬物は血中半減期が短く、またその大部分が頻回投与の注射剤であるため、薬剤投与における患者の負担は過大なものとなっている。したがって、できるだけ少量で薬効を発揮させ且つ投与回数も少なくできる、タンパク質またはペプチド薬剤の実用的な徐放型製剤が望まれている。

【0003】

薬効を持つタンパク質またはペプチドの徐放製剤においては、製剤調製時または徐放中の、タンパク質またはペプチドの変性あるいは凝集による回収率低下が、実用化への大きな障害となっている。ポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体 (PLGA) 等の生分解性高分子を基材にした徐放製剤が試みられているが、基材の疎水性、乾燥工程、pHの低下に起因するタンパク質の変性、凝集が報告されている (非特許文献1および2を参照)。一方、こうした問題が低減される親水性のハイドロゲルを基材に用いた徐放製剤も報告されているが、やはり実用化には至っていない。また、安全性の面からは、徐放基材として用いる素材は、非抗原性、非変異原性、無毒性、生分解性を併せ持つものでなければならず、タンパク質またはペプチドの封入率、回収率および安全性の全てにおいて、実用化レベルに達している徐放型製剤の実現は難しい。

【0004】

近年、多糖を薬物担体の基材として用いるという報告もある。その中でも、ヒアルロン酸 (HA) は、1934年、K. Meyerによって牛の眼の硝子体から単離された生体材料 (多糖) であり、細胞外マトリックスの主成分として古くから知られている。HAは、D-グルクロン酸とN-アセチルグルコサミンとが $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) グリコシド結合により連結された二糖単位から成るグルコサミドグリカンの一種である。

【0005】

HAは、化学的、物理的構造に種差が無く、ヒトも代謝系を持っており、免疫性、毒性といった面でも最も安全な医用生体材料 (Biomaterial) の一つである。近年、微生物による高分子量HAの大量生産が可能となり、変形性軟骨治療薬、化粧品等の分野でも実用化されている。

【0006】

HAを基材に用いた架橋方法、HAゲルからのタンパク質やペプチド薬物の徐放も多数報告されている。HAを化学架橋でゲル化させる方法としては、カルボジイミド法 (特許文献1参照)、ジビニルスルフォン法 (特許文献2参照)、グリシジルエーテル法 (特許文献3参照) 等が知られている。一般に、ゲル中にタンパク質またはペプチドを封入する場合は、架橋後にタンパク質またはペプチドを導入する方法では、HAとタンパク質またはペプチドとの相溶性、静電反発等の問題でその導入率は低い。一方でタンパク質またはペプチド存在下で、*in situ* 架橋を行う方法には、高封入率でタンパク質またはペプチドを担持させられる利点がある。こうした*in situ* 架橋により、HAゲル中にタンパク質またはペプチドを封入し、徐放させる製剤について報告されている (例えば、特許文献4参照)。しかし、こうした方法を用いてタンパク質またはペプチド存在下でHAを*in situ* 架橋することにより得られる徐放型製剤は、回収率の点で問題を有している。例えば、ヒドラジド基 (HZ) を導入したHA誘導体 (HA-HZ) をN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) からなる架橋剤で架橋する方法 (特許文献5参照) が報告されており、ここでは生理条件下での*in situ* 架橋を目的としてpH7.4~

pH 8.5で架橋形成反応を行っているが、この方法で得られるHAゲルからのタンパク質またはペプチドの回収率もやはり低いことが本発明者らの検討により確認されている。この原因は、架橋反応中にタンパク質またはペプチドの一部（主にアミノ基）が架橋剤と反応し、タンパク質が架橋してしまう点にある。またゲル中に残った変性したタンパク質またはペプチドは、生物活性が低下しており、むしろ抗原性発現の原因になる等の問題がある。封入した薬物が高回収率で放出されることは、医薬品として必須の条件であるにもかかわらず、タンパク質またはペプチドを反応させずにHAを化学架橋、ゲル化させる方法は知られていない。また、高回収率でタンパク質ペプチドを封入する方法として、ポリエチレングリコール（PEG）を基材に不飽和官能基を求核付加反応で架橋する報告もあるが（特許文献6参照）、生分解性でないPEG断片が残存する問題がある。

#### 【0007】

また、実際、こうした薬物徐放性物質を注射可能な製剤とするには、これを微粒子化する必要がある。こうした検討にスプレードライヤーは広く使用されており、インシュリン（非特許文献3、非特許文献4参照）、rh抗IgE抗体（非特許文献5参照）を微粒子化した報告、ヒアルロン酸の微粒子中に薬物を封入した報告（特許文献7参照、特許文献8）はあるが、共に短時間に皮下で溶解してしまうため薬物徐放期間は非常に短く、徐放目的としての実用性は低い。また、スプレードライ中にキトサンの架橋反応を行い、低分子薬物を封入する報告（非特許文献6参照）もあるが、放出期間は数分と短く、架橋剤に用いるアルデヒドがアミノ基などの官能基と高い反応性を有するため、タンパク質、ペプチド、その他のアミノ基などの官能基を有する低分子薬物には使用することができない。

【特許文献1】国際公開 WO94/02517号パンフレット

【特許文献2】特開昭61-138601号公報

【特許文献3】特開平5-140201号公報

【特許文献4】米国特許第5827937号明細書

【特許文献5】国際公開 WO95/15168号パンフレット

【特許文献6】国際公開 WO00/44808号パンフレット

【特許文献7】特許第3445283号公報

【特許文献8】国際公開 WO96/18647号パンフレット

【非特許文献1】J. Pharm. Sci. 第88巻、第166-173頁、1999年

【非特許文献2】J. Microencapsulation 第15巻、第699-713頁、1998年

【非特許文献3】Int. J. Pharm. 233, 227-237, 2002年

【非特許文献4】J. Control. Rel. 91, 385-394, 2003年

【非特許文献5】Biotech. and Bioeng. 60, 301-309, 1998年

【非特許文献6】Int. J. Pharm. 187, 53-65, 1999年

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0008】

上述した如く、タンパク質またはペプチド等の薬物の生物活性を維持したままin situで化学架橋、乾燥、微粒子化し、薬物を封入することで、高封入率、高回収率、安全性を満たすインジェクタブルな生分解性ゲル微粒子の調製方法、これを用いたタンパク質またはペプチド等の長期薬物徐放製剤は知られていない。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0009】

本発明者は、かかる課題を解決する為に鋭意研究を進めたところ、架橋形成反応が可能

な官能基を有するヒアルロン酸誘導体と薬物との溶液を、架橋反応の進行の遅い希薄な状態から架橋反応が進行する濃度に濃縮することで、濃縮中にH A間に架橋反応を起こさせ、薬物をヒアルロン酸架橋体中に封入することで、タンパク質またはペプチド等の薬物の生物活性を維持したままこれらを効率よく封入できることを見出した。また、この方法により得られた架橋ヒアルロン酸微粒子はインジェクタブルであり、生分解性で安全な長期薬物徐放微粒子担体としてタンパク質またはペプチド等の薬物を封入するのに最適であることを見出し、本発明を完成させた。

#### 【0010】

すなわち、本発明は、タンパク質またはペプチド等の薬物の生物活性を維持したままこれらを *in situ* で架橋、微粒子形成、および乾燥することにより得られる、ゲル中に封入したインジェクタブルなタンパク質またはペプチド等の薬物徐放製剤、及びその製造方法に関する。

#### 【0011】

すなわち本発明の一つの側面によれば、架橋多糖微粒子の製造方法であって、

- a) 架橋可能な官能基を有する多糖誘導体を含む希薄溶液を調製する工程；
- b) 当該溶液を微粒子状の液滴に分散する工程；および
- c) 当該液滴に含まれる溶液の濃縮により当該多糖誘導体の架橋反応を進行させる工程を含む前記製造方法が提供される。さらに本発明の別の側面によれば、前記工程 b) が、前記溶液を噴霧することにより微粒子状の液滴に分散する工程である、前記製造方法が提供される。

#### 【0012】

本発明のさらにその他の側面によれば、前記製造方法により調製することができる架橋多糖微粒子もまた提供される。

以下、本発明を更に具体的に説明する。

#### 【0013】

本発明で用いられる多糖誘導体は、架橋反応可能な官能基を有する多糖誘導体であれば特に制限されないが、好ましくは、グリコサミドグリカン（酸性ムコ多糖；例えば、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン4-硫酸、コンドロイチン6-硫酸、デルマトン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸など）の誘導体のうち架橋反応可能な官能基を有するものであり、特に好ましくは、架橋反応可能な官能基を有するヒアルロン酸誘導体である。

#### 【0014】

従って、本発明のさらに別の側面によれば、架橋ヒアルロン酸微粒子の製造方法であって、

- a) 架橋可能な官能基を有するヒアルロン酸誘導体を含む希薄溶液を調製する工程；
- b) 当該溶液を微粒子状の液滴に分散する工程；および
- c) 当該液滴に含まれる溶液の濃縮により当該ヒアルロン酸誘導体の架橋反応を進行させる工程を含む前記製造方法が提供される。さらに本発明の別の側面によれば、前記工程 b) が、前記溶液を噴霧することにより微粒子状の液滴に分散する工程である、前記製造方法が提供される。また、本発明のさらにその他の側面によれば、前記製造方法により調製することができる架橋ヒアルロン酸微粒子もまた提供される。

#### 【0015】

本発明の工程 a) における希薄溶液は、架橋反応に必要な基質および試薬などを含む溶液であるが溶媒により高度に希釈されているために反応の進行しないかまたは進行が極めて遅い溶液であり、その濃度は特に限定はされないが、例えば0.1%～5%、特に0.2%～3%である。また本発明に用いる溶媒としては、当該技術分野において通常用いられている溶媒またはそれらの混合物を用いることができ、特に限定はされないが、例えば水、DMSO、エタノール、N-メチルピロリドン、超臨界炭酸液などである。

#### 【0016】

本発明の工程 b) の希薄溶液を微粒子状の液滴に分散する方法には、当該技術分野で通

常用いられる方法であれば特に限定されないが、当該希薄溶液を噴霧する方法、当該希薄溶液を別の液体と混合することによりエマルジョンを形成する方法などが含まれる。ここで微粒子状の液滴は、特に限定されないが例えば  $0.04\text{ }\mu\text{m}\sim 1.5\text{ mm}$ 、好ましくは  $0.1\text{ }\mu\text{m}\sim 500\text{ }\mu\text{m}$  の平均粒子径を有することができる。

#### 【0017】

本発明の工程 c) における溶液の濃縮の方法は、架橋反応の進行をより早める濃度まで濃縮することができる手段であれば特に限定されない。また当該濃縮には、例えば、当該架橋反応が固相反応として進行するような溶媒が完全に除去された状態も含まれる。

#### 【0018】

本発明の架橋多糖微粒子は、架橋反応可能な官能基を有する多糖誘導体を含む溶液を、架橋反応の進行の遅い希薄な状態から架橋反応が進行する濃度に濃縮することで、濃縮中に多糖誘導体を架橋することにより製造することができる。また、架橋反応可能な官能基を有する多糖誘導体と薬物とを含む溶液を、架橋反応の進行の遅い希薄な状態から架橋反応が進行する濃度に濃縮することで、濃縮中に架橋反応を起こさせ、架橋反応と乾燥を同時に行うことで薬物を多糖架橋体中に封入した薬物担持微粒子とすることを特徴とする。

#### 【0019】

本発明により提供される、製造方法および当該製造方法により得られた、例えば架橋ヒアルロン酸微粒子などの架橋多糖微粒子は、好ましくは以下に示す特徴を有している。

1. 完全生分解性であり、生体に対する高い安全性を確保できる。
2. HAなどの多糖に架橋形成が可能な官能基をグラフトすることで、架橋点間距離を非常に小さく（例えばHAの場合、グルクロン酸当たり33モル%グラフトで約3 nm）することが可能であり、長期徐放を実現する上で有利である。
3. 高架橋密度である。
4. タンパク質を薬剤として用いる場合、タンパク質の変性を防ぐことができる。
5. 微粒子化、乾燥化、架橋化を一製造工程で行える。

#### 【0020】

本発明でいう架橋または化学架橋とは、共有結合による、分子間または分子内架橋結合を含むものであり、同時に分子間および分子内架橋結合を有する場合もある。

本発明で使用される架橋反応は、薬物、例えば、タンパク質やペプチドの共存下で架橋を形成しても薬物を変性させない架橋結合形成方法であれば特に限定されない。こうした反応としては、例えば、メルカプト基間のジスルフィド結合形成、メルカプト基と不飽和結合との間の付加反応、ヒドラジド基と活性カルボン酸エステル間の反応等が挙げられる。

#### 【0021】

架橋時のpHは特に限定されないが、タンパク質またはペプチドを変性させずに架橋形成の促進し、タンパク質またはペプチド等の薬物の含有アミノ基との反応を防ぐpHが好ましい。そのようなpHは当業者が適宜選択することが可能であるが、例えばpH 3.0～pH 9.0、好ましくはpH 4.5～pH 9.0である。

#### 【0022】

本発明に用いる多糖誘導体は、上記したような架橋反応が可能なものであれば特に限定されないが、具体的にはHAに架橋可能な官能基を導入したヒアルロン酸誘導体（HA誘導体）が挙げられる。本発明において用いられる架橋可能な官能基は、特に限定されないが、例えば、メルカプト基、不飽和結合を有する基（例えば、メタクリル基、アクリル基、ビニルスルホン基、アセチレンカルボニル基等）、ヒドラジド基（HZ基）等が挙げられる。

#### 【0023】

架橋反応が、メルカプト基同士のジスルフィド結合形成に由来する場合は、例えばメルカプト基を導入したHA誘導体などの多糖誘導体のみを用いて架橋を形成することができ、もしくはこれに架橋剤としてメルカプト基を2つ以上有する化合物（例えば、ジチオトレイトール（DTT）、ブタンジチオール、ポリエチレングリコールジチオール、システ



インを2つ以上含むペプチド等)を添加して架橋を形成することもできる。また、架橋反応速度を高める目的で、テトラチオン酸ナトリウム (Sodium tetrathionate: S T T)、ジピリジルジスルヒド (Dipyridyl disulfide)、エルマン試薬 (Ellman's reagent: D T N B) 等の化合物を添加しても良い。この際、未反応のメルカプト基がゲル中に残存するとタンパク質やペプチドの変性に繋がる可能性があるため、反応効率をできるだけ上げるためにこれら化合物をメルカプト基に対して0.1モル倍~2モル倍添加するのが好ましい。さらに好ましくは0.5モル倍~1.5モル倍である。

#### 【0024】

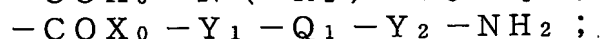
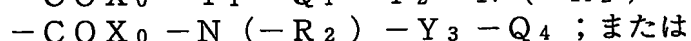
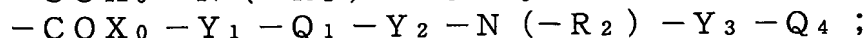
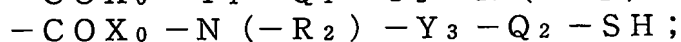
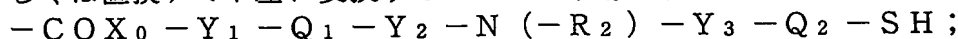
メルカプト基を導入した多糖誘導体の調製方法は、特に限定されないが、例えば、HAを3級アンモニウム塩にして、DMSO等の極性有機溶媒に溶解し、EDC等のカップリング剤存在下、メルカプト基を有するアミンまたはヒドラジドと反応させる方法などにより、調製することができる。メルカプト基を有するアミンは、特に限定されないが、例えば、2-アミノエタン-1-チオール、3-アミノプロパン-1-チオール、チオグリコール酸ヒドラジド、などを挙げることができる。

#### 【0025】

また、HAにメルカプト基を導入する場合、高い架橋密度を実現できるという理由で、まずアミノ基やヒドラジド基を導入し、その後このアミノ基やヒドラジド基にメルカプト基を導入する方法が好ましい。例えばHAのカルボン酸と、アジピン酸ジヒドラジド (ADH) またはエチレンジアミン等の2価のH Zまたはアミノ基含有化合物とをEDC等の縮合剤で縮合させ、ヒドラジド基を導入したHA誘導体 (HA-H Z) またはアミノ基を導入したHA誘導体 (HA-アミノ基) を合成し、これに例えばN-スクシンイミジル 3-[2-ピリジルジチオ]プロピオネート (SPDP) を反応させ、D T T等の還元剤で還元、メルカプト基とする方法、あるいは2-イミノチオレイン (Trout's Reagent) をヒドラジド基、あるいはアミノ基と反応させる方法などが挙げられる。

#### 【0026】

本発明における架橋可能な官能基は、例えば多糖の分子内に含まれるカルボキシル基を以下のようなメルカプト基、不飽和結合、アミノ基またはヒドラジル基を含むエステル基もしくは置換アミド基に変換することにより導入することができる:



(式中、 $X_0$  は、 $-O-$ 、または $-N(-R_1)-$ であり、

$R_1$  は、水素原子、直鎖または分枝 $C_{1-10}$ アルキル基、直鎖または分枝 $C_{1-10}$ ヒドロキシアルキル基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、またはポリエステル基であり、

$Y_1$  は、単結合、 $-N(-R_3)CO-$ 、 $-N(-R_3)-$ 、 $-CO-$ 、または $-CH_2CO-$ であり、

$Y_2$  は、単結合、 $-CON(-R_4)-$ 、または $-N(-R_4)-$ 、であり、

$Q_1$  は、直鎖または分枝 $C_{1-10}$ アルキレン基、直鎖または分枝 $C_{1-10}$ ヒドロキシアルキレン基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、またはポリエステル基であり、

$R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  は、それぞれ独立して、水素原子、直鎖または分枝 $C_{1-10}$ アルキル基、直鎖または分枝 $C_{1-10}$ ヒドロキシアルキル基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、またはポリエステル基であり、

$Y_3$  は、単結合、 $-CO-$ 、 $-CO_2-$ 、 $-CH_2-CH(OH)-$ 、または $-CONH-$ であり、

$Q_2$  は、直鎖または分枝 $C_{1-10}$ アルキレン基、直鎖または分枝 $C_{1-10}$ ヒドロキシアルキレン基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、またはポリエステル基

であり、

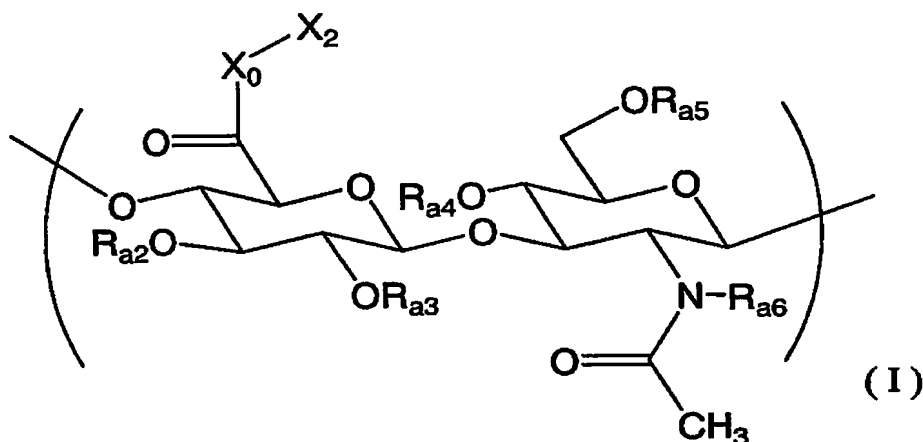
Q<sub>4</sub> は、直鎖もしくは分枝 C<sub>2</sub>-10 アルケニル基、または、直鎖もしくは分枝 C<sub>2</sub>-10 アルキニル基である。)

【0027】

メルカプト基を導入した多糖誘導体の例には、好ましくは式 (I) :

【0028】

【化1】



(式中、X<sub>2</sub> は、-Y<sub>1</sub>-Q<sub>1</sub>-Y<sub>2</sub>-N(-R<sub>2</sub>)-Y<sub>3</sub>-Q<sub>2</sub>-SH、または-N(-R<sub>2</sub>)-Y<sub>3</sub>-Q<sub>2</sub>-SHであり、

X<sub>0</sub> は、-O-、または-N(-R<sub>1</sub>)-であり、

R<sub>1</sub> は、水素原子、直鎖または分枝 C<sub>1</sub>-10 アルキル基、直鎖または分枝 C<sub>1</sub>-10 ヒドロキシアリル基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、またはポリエステル基であり、

R<sub>a2</sub>、R<sub>a3</sub>、R<sub>a4</sub>、R<sub>a5</sub> および R<sub>a6</sub> は、それぞれ独立して、水素原子、直鎖または分枝 C<sub>1</sub>-6 アルキル基、直鎖または分枝 C<sub>1</sub>-6 アルケニル基、直鎖または分枝 C<sub>1</sub>-6 アルキニル基、直鎖または分枝 C<sub>1</sub>-6 アルキルカルボニル基、直鎖または分枝 C<sub>1</sub>-6 アルケニルカルボニル基、直鎖または分枝 C<sub>1</sub>-6 アルキニルカルボニル基、または-SO<sub>2</sub>OHであり、

Y<sub>1</sub> は、単結合、-N(-R<sub>3</sub>)-CO-、-N(-R<sub>3</sub>)-、-CO-、または-CH<sub>2</sub>CO-であり、

Y<sub>2</sub> は、単結合、-CON(-R<sub>4</sub>)-、または-N(-R<sub>4</sub>)-であり、

Q<sub>1</sub> は、直鎖または分枝 C<sub>1</sub>-10 アルキレン基、直鎖または分枝 C<sub>1</sub>-10 ヒドロキシアリレン基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、またはポリエステル基であり、

R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> は、それぞれ独立して、水素原子、直鎖または分枝 C<sub>1</sub>-10 アルキル基、直鎖または分枝 C<sub>1</sub>-10 ヒドロキシアリル基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、またはポリエステル基である。

【0029】

Y<sub>3</sub> は、単結合、-CO-、-CO<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-CH(OH)-、または-CONH-であり、

Q<sub>2</sub> は、直鎖または分枝 C<sub>1</sub>-10 アルキレン基、直鎖または分枝 C<sub>1</sub>-10 ヒドロキシアリレン基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、またはポリエステル基である。)

で示される繰り返し構造を、少なくとも 1 以上分子内に有するヒアルロン酸誘導体が含まれる。

【0030】

また式 (I) 中、ポリアルキレンオキサイド基とは、-(CH(-R)CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-

OH (式中、Rは水素原子、または $C_1 - 5$  アルキル基)で示される基であり、好ましくは、ポリエチレンオキシド基、ポリプロピレンオキシド基であり、また好ましくは $n$ は、1~20の整数である。またポリペプチド基は、特に限定されるものではないが、好ましくはアミノ酸1~20個からなるものである。またポリエステル基は、特に限定されるものではないが、好ましくはポリグリコール酸基、ポリ乳酸基である。

#### 【0031】

さらに、式(I)において、 $X_0$ は、好ましくは $-N(-R_1)-$ であり、 $R_1$ は、好ましくは水素原子であり、 $X_2$ は、好ましくは $-Y_1-Q_1-Y_2-N(-R_2)-Y_3-Q_2-SH$ である。さらに式(II)において、 $Y_1$ は、好ましくは単結合または、 $-N(-R_3)-$ であり、 $Y_2$ は、好ましくは単結合であり、 $Q_1$ は、好ましくは直鎖または分枝 $C_1 - 4$  アルキレン基である。さらに式(II)において、 $R_2$ および $R_3$ は、好ましくは水素原子であり、 $Y_3$ は、好ましくは $-CO-$ であり、好ましくは $Q_2$ は、直鎖または分枝 $C_1 - 4$  アルキレン基である。

#### 【0032】

メルカプト基と不飽和結合との間の付加反応を架橋反応として利用する場合は、不飽和結合を有する基を導入したHA誘導体などの多糖誘導体とメルカプト基を2つ以上有する化合物(例えば、ジチオトレイトール(DTT)、ブタンジチオール、ポリエチレングリコールジチオール、システインを2つ以上含むペプチド、メルカプト基を導入したHA誘導体等)を混和しても良いし、逆に、メルカプト基を導入した多糖誘導体と不飽和結合を有する基を2つ以上有する化合物(例えば、エチレングリコールジメタクリレート、エチレンビスアクリルアミド、トリス-2-マレイミドエチルアミン、1,8-ビスマレイミドポリエチレングリコール、1,4-ビスマレイミジル-2,3-ジヒドロキシブタン、不飽和結合を導入したHA誘導体等)を混和しても良い。また、この場合、架橋反応時のタンパク質またはペプチドの安定性向上、反応速度の向上の為にトリエタノールアミン等の塩基性化合物を添加することが好ましい。この際好ましい濃度としては、 $10 \mu L/mL \sim 20 \mu L/mL$ である。

#### 【0033】

不飽和基を導入した多糖誘導体の調製方法は、特に限定されないが、例えば、メタクリル酸グリシジルエーテルや、無水メタクリル酸等をHAの水酸基に直接反応させる方法(J. Biomed. Mat. Res. 54, 115-121, 2001)では高い導入率は得難い。これは、HAが水溶液中で水素結合、疎水性相互作用による高次構造を形成し、ヒドロキシル基、カルボン酸基等の官能基の反応性が低いためと考えられる。タンパク質やペプチドの徐放期間を延ばすには、高い架橋密度が望ましい。このためには、グルクロン酸部分のカルボキシル基に置換基を導入するのが望ましい。例えば、HAを3級アンモニウム塩にして、DMSO等の極性有機溶媒に溶解し、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)等のカップリング剤存在下、不飽和結合を有するアミンまたはヒドラジドと反応させる方法などにより、調製することができる。不飽和結合を有するアミンは、特に限定されないが、例えば、アリルアミン、ジアリルアミン、4-アミノ-1-ブテン、アクリルヒドラジド、メタクリルヒドラジド等を挙げることができる。

#### 【0034】

また上述の高い架橋密度を実現できるという点において、アミノ基やヒドラジド基を導入し、その後、このアミノ基やヒドラジド基に不飽和結合を有する基を導入する方法が好ましい。例えばHAのカルボン酸と、アジピン酸ジヒドラジド(ADH)またはエチレンジアミン等の2価のHZまたはアミノ基含有化合物とを、EDC等の縮合剤で縮合させ、ヒドラジド基修飾されたHA誘導体(HA-HZ)またはアミノ基修飾されたHA誘導体(HA-アミノ基)を合成し、これに無水メタクリル酸、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)活性化アクリル酸を反応させる方法などが挙げられる。

#### 【0035】

HAなどの多糖に不飽和結合を有する基を導入後、メルカプト基で架橋する場合、メル

カプト基の不飽和結合を有する基に対する比率は特に限定されず、当業者が適宜選択することが可能であるが、タンパク質、ペプチドとの反応を最小にし、且つ、不飽和基のゲル中の残存を防ぎ、且つ、速やかに反応させるため、メルカプト基：不飽和結合を有する基 = 3 : 1 ~ 1 : 2 が好ましい。更に好ましくは、2 : 1 ~ 1 : 1 である。

【0036】

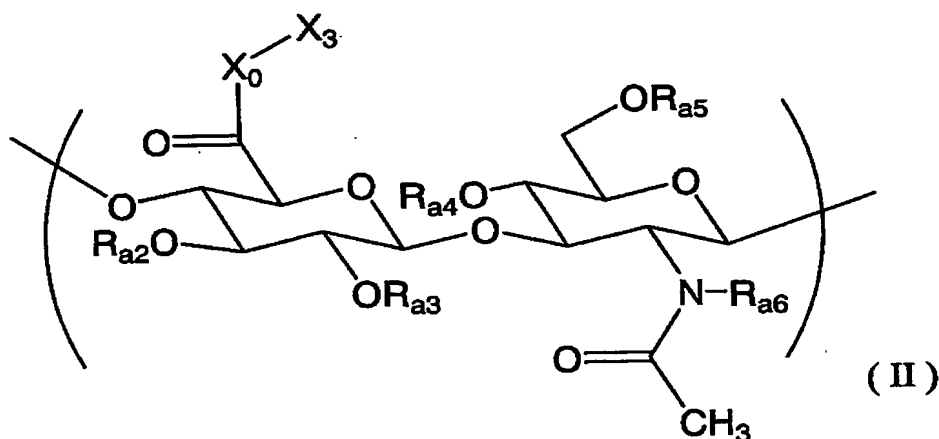
HAにメルカプト基を導入後、不飽和結合を有する基で架橋する場合、不飽和結合を有する基のメルカプト基に対する比率は特に限定されず、当業者が適宜選択することが可能であるが、タンパク質、ペプチドとの反応を最小にし、且つ、不飽和基のゲル中の残存を防ぎ、且つ、速やかに反応させるため、不飽和結合を有する基：メルカプト基 = 3 : 1 ~ 1 : 2 が好ましい。更に好ましくは、2 : 1 ~ 1 : 1 である。

【0037】

不飽和結合を有する基を導入した多糖誘導体の例には、好ましくは式 (II) :

【0038】

【化2】



(式中、 $X_0$  は、 $-O-$ 、または  $-N(-R_1)-$  であり、

$X_3$  は、 $-Y_1-Q_1-Y_2-N(-R_2)-Y_3-Q_4$ 、または  $-N(-R_2)-Y_3-Q_4$  であり、

$R_1$  は、水素原子、直鎖または分枝  $C_{1-10}$  アルキル基、直鎖または分枝  $C_{1-10}$  ヒドロキシアルキル基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、またはポリエステル基であり、

$R_{a2}$ 、 $R_{a3}$ 、 $R_{a4}$ 、 $R_{a5}$  および  $R_{a6}$  は、それぞれ独立して、水素原子、直鎖または分枝  $C_{1-6}$  アルキル基、直鎖または分枝  $C_{1-6}$  アルケニル基、直鎖または分枝  $C_{1-6}$  アルキニル基、直鎖または分枝  $C_{1-6}$  アルキルカルボニル基、直鎖または分枝  $C_{1-6}$  アルケニルカルボニル基、直鎖または分枝  $C_{1-6}$  アルキニルカルボニル基、または  $-SO_2OH$  であり、

$Y_1$  は、単結合、 $-N(-R_3)CO-$ 、 $-N(-R_3)-$ 、 $-CO-$ 、または、 $-CH_2CO-$  であり、

$Y_2$  は、単結合、 $-CON(-R_4)-$ 、または  $-N(-R_4)-$  であり、

$Y_3$  は、単結合、 $-CO-$ 、または、 $-CH_2CO-$  であり、

$Q_1$  は、直鎖または分枝  $C_{1-10}$  アルキレン基、直鎖または分枝  $C_{1-10}$  ヒドロキシアルキレン基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、またはポリエステル基であり、

$R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  は、それぞれ独立して、水素原子、直鎖または分枝  $C_{1-10}$  アルキル基、直鎖または分枝  $C_{1-10}$  ヒドロキシアルキル基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、またはポリエステル基であり、

$Q_4$  は、直鎖もしくは分枝  $C_{2-10}$  アルケニル基、または、直鎖もしくは分枝  $C_{2-10}$  アルキニル基である。)

で示される繰り返し構造を、少なくとも1以上分子内に有するヒアルロン酸誘導体などが含まれる。

#### 【0039】

ここで式(I I)中、ポリアルキレンオキシド基とは、 $-(CH(-R)CH_2O)_n-OH$  (式中、Rは水素原子、または $C_1-5$ アルキル基)で示される基であり、好ましくは、ポリエチレンオキシド基、ポリプロピレンオキシド基であり、また好ましくはnは、1~20の整数である。またポリペプチド基は、特に限定されるものではないが、好ましくはアミノ酸1個~20個からなるものである。またポリエステル基は、特に限定されるものではないが、好ましくはポリグリコール酸基、ポリ乳酸基である。

#### 【0040】

さらに、式(I I)において、 $X_0$ は、好ましくは $-N(-R_1)-$ であり、 $R_1$ は、好ましくは水素原子であり、 $X_3$ は、好ましくは $-Y_1-Q_1-Y_2-N(-R_2)-Y_3-Q_4$ である。さらに式(I I)において、 $Y_1$ は、好ましくは単結合、 $-N(-R_3)CO-$ 、または、 $-N(-R_3)-$ であり、さらに好ましくは $-N(-R_3)CO-$ である。また $Y_2$ は、好ましくは単結合、 $-CON(-R_3)-$ であり、さらに好ましくは $-CON(-R_3)-$ であり、 $Y_3$ は好ましくは単結合、 $-CO-$ 、または、 $-N(-R_3)-$ であり、さらに好ましくは、 $-CO-$ である。さらに式(I I)において、 $Q_1$ は好ましくは直鎖または分枝 $C_1-4$ アルキレン基であり、 $R_2$ および $R_3$ は、好ましくは水素原子であり、 $Q_4$ は好ましくは直鎖または分枝 $C_2-10$ アルケニル基である。

#### 【0041】

また、メルカプト基を導入した多糖誘導体の例には、上述の式(I)で示される繰り返し構造を、少なくとも1以上分子内に有するヒアルロン酸誘導体などが含まれる。

架橋反応に、ヒドラジド基を導入したHA酸誘導体などの多糖誘導体と活性カルボン酸の反応を利用することもできる。多糖へのヒドラジド基の導入は当業者に公知の方法で行うことができ、例えばヒアルロン酸のカルボキシル基と2価のヒドラジド含有化合物(ジヒドラジド化合物)を、縮合剤を用いて縮合させることにより合成することができる。ジヒドラジド化合物としては、コハク酸ジヒドラジド、グルタル酸ジヒドラジド、アジピン酸ジヒドラジド、ピメリン酸ジヒドラジドが挙げられる。また、縮合剤としては、1, 3-ジシクロヘキシルカルボジイミド、1, 3-ジイソプロピルカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどが挙げられる。例えば、ヒアルロン酸のカルボン酸とアジピン酸ジヒドラジド(ADH)を1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)で縮合させ、ヒドラジド基で修飾されたヒアルロン酸(HA-HZ)を合成することが可能である。架橋剤としては、HZ基と反応しうる官能基であれば特に限定されないが、例えば、NHSで活性化されたエステル基、ペンタフルオロフェノキシカルボニル基、p-ニトロフェノキシカルボニル基、イミダゾリルカルボニル基、イソチオシアナト基、スルホニルクロリド基、スルホニルフルオリド基、ホルミル基、ビニルスルホニル基、酸無水物、4-ニトロフェニルホルメート基等の官能基を同一分子内に2つ以上持つ分子が挙げられる。当該架橋剤の例には、ビス[スルホスクシンイミジル]スベレート、ジスクシンイミジルグルタレート、ジスクシンイミジルトルトレート、エチレングリコールビス[スクシンイミジルスクシネート]などが含まれる。

#### 【0042】

アミノ基に対するHZ基との選択的反応性、タンパク質の変性等を考慮すれば、架橋時のpHは、pH 3.0~pH 6.0が好ましい。さらに好ましくは、pH 4.0~pH 6.0である。架橋反応中のpHをこの範囲に保つため、用いるバッファーは揮発性の低いもの、例えばクエン酸等が好ましい。架橋剤中のヒドラジド基と反応する化合物官能基は、ゲル調製液中のヒドラジド基に対して40モル%以下であることが好ましく、さらに好ましくは20モル%以下、特に好ましくは10モル%以下である。

#### 【0043】

架橋反応可能な官能基のHAへの導入率は、特に限定されないが、生体内で流動性のな

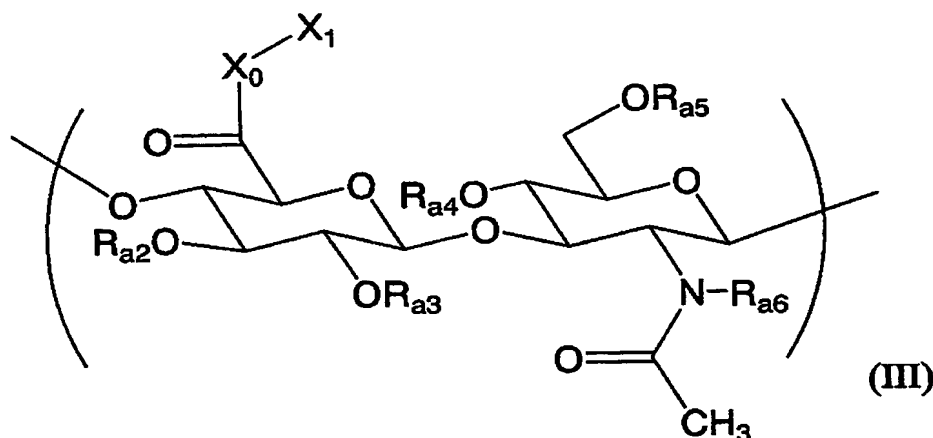
いゲルを得るためにHAのグルクロン酸当たり5モル%以上が好ましく、10モル%以上が特に好ましい。また、薬物の徐放性能は架橋されたHA誘導体の架橋密度に大きく依存するため、この導入率を制御することで薬物の徐放期間を制御することができる。

【0044】

ヒドラジド基が導入された多糖酸誘導体の例には、式(III)：

【0045】

【化3】



(式中、X<sub>0</sub> は、-N(-R<sub>1</sub>)-、または-O-であり、  
R<sub>1</sub> は、水素原子、直鎖または分枝C<sub>1</sub>-10アルキル基、直鎖または分枝C<sub>1</sub>-10ヒドロキシアルキル基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、ポリエステル基であり、

X<sub>1</sub> は、-Y<sub>1</sub>-Q<sub>1</sub>-Y<sub>2</sub>-NHNH<sub>2</sub>であり、

R<sub>a2</sub>、R<sub>a3</sub>、R<sub>a4</sub>、R<sub>a5</sub> およびR<sub>a6</sub> は、それぞれ独立して、水素原子、直鎖または分枝C<sub>1</sub>-6アルキル基、直鎖または分枝C<sub>1</sub>-6アルケニル基、直鎖または分枝C<sub>1</sub>-6アルキニル基、直鎖または分枝C<sub>1</sub>-6アルキルカルボニル基、直鎖または分枝C<sub>1</sub>-6アルケニルカルボニル基、直鎖または分枝C<sub>1</sub>-6アルキニルカルボニル基、または-SO<sub>2</sub>OHであり、

Y<sub>1</sub> は、単結合、-N(-R<sub>3</sub>)-CO-、-N(-R<sub>3</sub>)-、-CO-、または-CH<sub>2</sub>CO-であり、

Q<sub>1</sub> は、単結合、直鎖または分枝C<sub>1</sub>-10アルキレン基、直鎖または分枝C<sub>1</sub>-10ヒドロキシアルキレン基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、ポリエステル基であり、

Y<sub>2</sub> は、単結合、-N(-R<sub>4</sub>)-CO-、-CO-、または、-CH<sub>2</sub>CO-であり、

R<sub>3</sub> およびR<sub>4</sub> は、それぞれ独立して、水素原子、直鎖または分枝C<sub>1</sub>-10アルキル基、直鎖または分枝C<sub>1</sub>-10ヒドロキシアルキル基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、ポリエステル基である。)

で示される繰り返し構造を、少なくとも1以上分子内に有するヒアルロン酸誘導体が含まれる。

【0046】

さらに、式(III)において、X<sub>0</sub> は、好ましくは-N(-R<sub>1</sub>)-であり、R<sub>1</sub> は、好ましくは水素原子であり、R<sub>a2</sub>、R<sub>a3</sub>、R<sub>a4</sub>、R<sub>a5</sub> およびR<sub>a6</sub> は、好ましくは水素原子であり、Y<sub>1</sub> は、好ましくは単結合、または、-CO-であり、Q<sub>1</sub> は、好ましくは直鎖または分枝C<sub>1</sub>-10アルキレン基であり、Y<sub>2</sub> は、好ましくは、単結合、または、-CO-であり、R<sub>3</sub> は、好ましくは水素原子であり、R<sub>4</sub> は、好ましくは水素原子である。

【0047】

また式(III)中、ポリアルキレンオキサイド基とは、-(CH(-R)CH<sub>2</sub>O)-

$n-OH$  (式中、Rは水素原子、または $C_1-5$ アルキル基)で示される基であり、好ましくは、ポリエチレンオキシド基、ポリプロピレンオキシド基であり、また $n$ は、好ましくは1~20の整数である。またポリペプチド基は、特に限定されるものではないが、好ましくはアミノ酸1~20個からなるものである。またポリエステル基は、特に限定されるものではないが、好ましくはポリグリコール酸基、ポリ乳酸基である。

#### 【0048】

本発明の架橋ヒアルロン酸微粒子の製造方法としては、微粒子の溶媒留去による乾燥と架橋反応が同時に進行する製造方法であれば良い。例えば、液体を噴霧乾燥するスプレードライヤーを用い、架橋反応可能な官能基を有するヒアルロン酸誘導体と薬物とを含む溶液を噴霧乾燥することで、濃縮乾燥中にヒアルロン酸誘導体を架橋し、薬物をヒアルロン酸架橋体中に封入した薬物担持微粒子を得ればよい。スプレードライを用いる場合は、薬物の変性を防ぐために、乾燥温度は100℃以下であることが好ましい。

#### 【0049】

あるいは、架橋反応可能なHA誘導体(テトラブチルアンモニウム塩)と薬物をDMSO等の極性有機溶媒に溶かしておき、二酸化炭素等の超臨界液体を添加、DMSOを抽出することでヒアルロン酸濃縮中に架橋反応を起こさせ、微粒子を得ても良い。これらの微粒子化方法を用いる時は、Tween-20、Tween-80等の界面活性剤を添加(1%~2%程度)することで、生成された微粒子の回収率を上げることができる。また、これらの製造方法を取る場合、濃縮前の架橋反応を起こさない調製液を用いる必要がある。架橋剤混合から濃縮までの時間、架橋性官能基の導入率、ヒアルロン酸分子量、濃度によって異なるが、架橋性官能基の導入率は、5モル%~70モル%、ヒアルロン酸分子量は、1万ダルトン~200万ダルトン、ヒアルロン酸濃度は、0.1%~5%が好ましい。

#### 【0050】

また、別法としては、架橋反応可能な官能基を有するヒアルロン酸誘導体と薬物とを含む水溶液を脱水性を有する液体(例えば、分子量400ダルトンのポリエチレングリコール等)の中にエマルジョン化することで、脱水濃縮中にヒアルロン酸を架橋し、薬物をヒアルロン酸架橋体中に封入した薬物担持微粒子を得ることもできる。この方法を用いる時は、封入効率を上げるため、カチオン性かノニオン性の薬物が好ましい。

#### 【0051】

乾燥後の微粒子径は、用途によって最適化すればよいが、インジェクタブルにするために通常、 $0.01\mu m \sim 150\mu m$ が好ましい。経鼻、経肺投与の時は、 $0.01\mu m \sim 5\mu m$ が吸入効率の点で好ましく、静注投与の時には、 $0.01\mu m \sim 0.2\mu m$ 程度が血中動態の点から好ましい。

#### 【0052】

本発明に用いられるHAは、どのようにして得られたHAでもよく、動物組織から抽出されたHA、発酵法で得られたHA、化学合成で得られたHAなど、その由来は限定されない。さらに、加水分解処理など、HAにさらなる処理を行ってもよい。本発明のHAには、様々な方法で修飾された修飾HAや、ナトリウム、カリウム、リチウムなどのアルカリ金属塩なども含有される。HAはカルボキシル基とヒドロキシル基が修飾されることが多いが、本発明において修飾HAはどの部分が修飾されていてもよい。修飾HAは特に限定されず、どのような修飾がされていてもよいが、例えば、硫酸化されたHA(WO95/25751)、N-硫酸化されたHA(WO98/45335)、エステル化されたHA(EP0216453、WO98/08876、EP0341745)、過沃素酸酸化されたHA、アミド修飾されたHAなどを挙げることができる。

#### 【0053】

本発明に用いられる原料HAの分子量は特に限定されず、いかなる分子量のHAでも使用することが可能であるが、通常5000ダルトン~350万ダルトン、好ましくは1万ダルトン~100万ダルトンのHAを用いることができる。また、HAの分子量と濃度は、製造後の粒子径に影響するため、目的とする粒子径に応じて選択すればよい。

#### 【0054】

薬効を持つタンパク質、ペプチドとしては特に限定されないが、例えば、エリスロポエチン (EPO)、グラニューロサイトコロニー刺激因子 (G-CSF)、インターフェロン- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、(INF- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )、トロンボポエチン (TPO)、シリアリーニュートロフィクファクター (CNTF)、チューマーネクロシスファクター結合タンパク質 (TNFbp)、インターロイキン-10 (IL-10)、FMS類似チロシンカイネース (Flt-3)、成長ホルモン (GH)、インシュリン、インシュリン類似成長因子-1 (IGF-1)、血小板由来成長因子 (PDGF)、インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト (IL-1ra)、ブレイン由来ニューロトロフィクファクター (BDNF)、ケラチノサイト成長因子 (KGF)、幹細胞因子 (SCF)、メガカリオサイト成長分化因子 (MGDF)、オステオプロテゲリン (OPG)、レプチン、副甲状腺ホルモン (PTH)、塩基性フィブロblast成長因子 (b-FGF)、骨形成タンパク質 (BMP)、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)、脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP)、C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP)、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)、抗体、ダイアボディー等が挙げられる。また本発明の薬物徐放担体は、低分子量化合物の薬剤にも使用することができる。低分子薬剤としては、制癌剤 (例えば、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アルカロイド)、免疫抑制剤、抗炎症剤 (例えば、ステロイド剤、非ステロイド剤系抗炎症剤)、抗リウマチ剤、抗菌剤 (例えば、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、マクロライド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、新キノロン系抗生物質、サルファ剤)などを挙げることができる。

#### 【0055】

本発明の徐放担体は、1種もしくはそれ以上の薬学的に許容し得る希釈剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、補助剤、防腐剤、緩衝剤、結合剤、安定剤等を含む薬学的組成物として、目的とする投与経路に応じ、適当な任意の形態にして投与することができる。投与経路は非経口的経路であっても経口的経路であってもよい。

#### 【実施例】

#### 【0056】

#### EPO封入架橋ヒアルロン酸微粒子の調製

以下、本発明の好適な実施例についてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 【0057】

NMR測定は、核磁気共鳴装置 JNM-ECA500 (日本電子株式会社製) を用いて重水を溶媒に用いて測定した。また置換基の導入率の決定は、導入した置換基特有のピークとヒアルロン酸由来のピークの積分比より決定した。

#### 【実施例1】

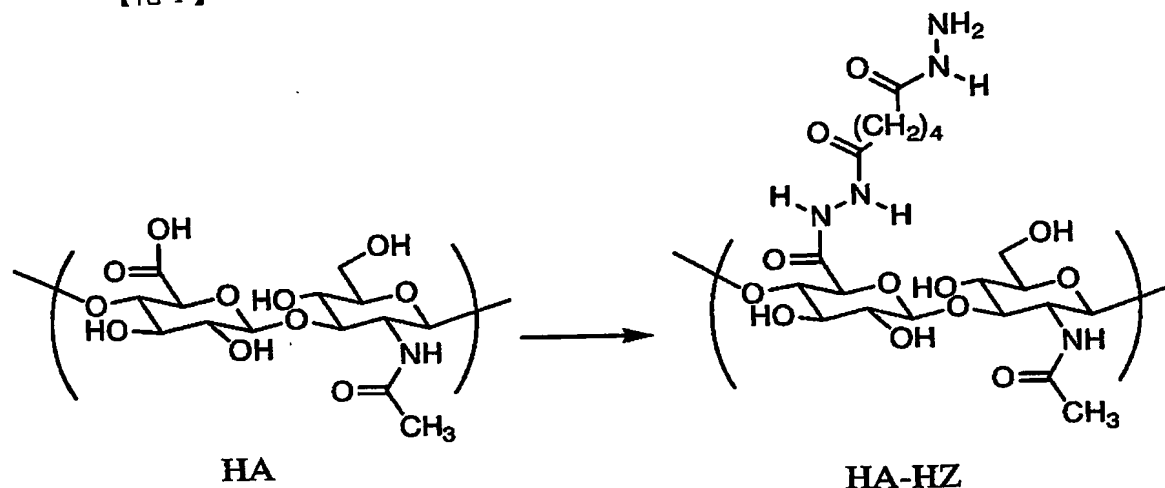
#### 【0058】

【実施例1-1】 ヒドラジド基 (HZ基) が導入されたヒアルロン酸誘導体 (HA-HZ) の合成

#### 【0059】



## 【化4】



分子量  $1.9 \times 10^5$  ダルトンのヒアルロン酸 (HA) (電気化学工業株式会社製) 200mg を 0.5% 濃度で蒸留水に溶解し、5N 塩酸で pH を 4.7 ~ 4.8 に調製した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC) とアジピン酸ジヒドラジド (ADH) を、HA:EDC:ADH=1:0.3:40 (バッチ1-1)、1:1:40 (バッチ1-2)、1:5:40 (バッチ1-3) モル比になるよう添加し、5N 塩酸で pH を 4.7 ~ 4.8 に保ちながら室温で攪拌下 2 時間反応させた。100mM 塩化ナトリウム溶液、25% エタノール溶液で透析 (スペクトラポア7、分画分子量 (MWCO): 12k-14k ダルトン) し、凍結乾燥して標題の HA-HZ を得た。

## 【0060】

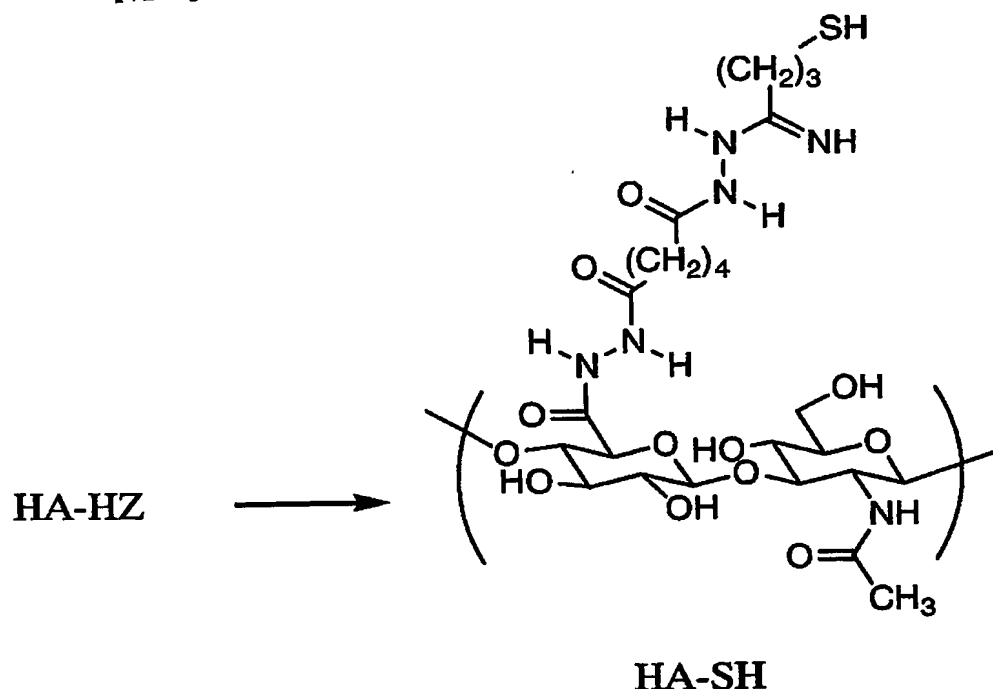
得られた HA-HZ 中の HZ 基導入率をプロトン NMR 法で定量したところ、それぞれ、HA のカルボン酸の 26% (バッチ1-1)、46% (バッチ1-2)、69% (バッチ1-3) が HZ 化されていた (HA および HA-HZ の N-アセチル基、1.9 ppm (3H)、HA-HZ のアジピン酸由来部分のメチレン基、1.6 ppm、2.3 ppm (各 2H) を比較)。

## 【0061】

【実施例1-2】メルカプト基 (SH) が導入されたヒアルロン酸誘導体 (HA-SH) の合成

## 【0062】

【化5】



実施例1-1のバッチ1~3のHA-HZ、各々100mgを5mLの100mMリン酸バッファーpH8に溶かし(HA-HZ:2%w/v)、イミノチオラン(ITL)を添加し(HZ/ITL=1/2モル比)、室温で攪拌下2~4時間反応させた。エタノールで沈殿、3回洗浄し、乾燥させた。また、得られたHA-SH中のSH基導入率をプロトンNMR法で定量した結果を表1に示す。(HAおよびHA-SHのN-アセチル基、1.9ppm(3H)、HA-SHのITL由来部分のメチレン基、2.1ppmと2.7ppm(各2H)を比較)。

【0063】

【表1】

表1

	対照	バッチ1	バッチ2	バッチ3
HZ基の導入率	0%	26%	46%	69%
SH基の導入率	0%	20%	35%	56%

【実施例1-3】 EPO封入架橋ヒアルロン酸微粒子の調製

実施例1-2のバッチ1の、SH基の導入率が20モル%であるHA-SH200mgと、エリスロポエチン(EPO)2mgを20mLの10mMリン酸バッファーpH8(PB)に溶かした(室温、1時間攪拌)。これに、4mgのTween-20、SH基に対して1モル倍のテトラチオン酸ナトリウム(Sodium tetrathionate:STT)22.3mgを加えた。この溶液を以下の条件でスプレードライし、微粒子を得た。

スプレードライヤー:ピュッヒ社製、ミニスプレードライヤー B-191

Solution feed rate: 1.5 mL/min (Tygon tube, Pump speed = 15%)

Feed solution concentration: 10 mg/mL

Atomizing air flow rate: 650 L/hr

Drying air flow rate: 40 kL/hr (Aspiration speed = 65%)

Inlet temperature: 85°C ~ 95°C

Outlet temperature : 50 ~ 60° C

【実施例 2】

【0064】

実施例 1-3 の実験操作において、バッチ 2 の S H 基の導入率が 35 モル%である H A-SH を 200 mg と、テトラチオン酸ナトリウム (Sodium tetrathionate: S T T) 39.0 mg (S H 基に対して 1 モル倍) を使用したこと以外は実施例 1-3 と同様の方法で E P O 封入架橋ヒアルロン酸微粒子を調製した。

【実施例 3】

【0065】

実施例 1-3 の実験操作において、バッチ 3 の S H 基の導入率が 56 モル%である H A-SH を 200 mg と、テトラチオン酸ナトリウム (Sodium tetrathionate: S T T) 62.4 mg (S H 基に対して 1 モル倍) を使用したこと以外は実施例 1-3 と同様の方法で E P O 封入架橋ヒアルロン酸微粒子を調製した。

【実施例 4】

【0066】

実施例 1-3 の実験操作において、バッチ 3 の S H 基の導入率が 56 モル%である H A-SH を 200 mg と、S H 基に対して 0.7 モル倍のテトラチオン酸ナトリウム (Sodium tetrathionate: S T T) 38.9 mg を使用したこと以外は実施例 1-3 と同様の方法で E P O 封入架橋ヒアルロン酸微粒子を調製した。

【実施例 5】

【0067】

実施例 1-3 の実験操作において、バッチ 3 の S H 基の導入率が 56 モル%である H A-SH を 200 mg と、S H 基に対して 0.5 モル倍のテトラチオン酸ナトリウム (Sodium tetrathionate: S T T) 27.8 mg を使用したこと以外は実施例 1-3 と同様の方法で E P O 封入架橋ヒアルロン酸微粒子を調製した。

【実施例 6】

【0068】

実施例 3 の実験操作において、4 mg の T w e e n-20 の代わりに、T w e e n-80 を 4 mg 使用したこと以外は実施例 3 と同様の方法で E P O 封入架橋ヒアルロン酸微粒子を調製した。

【実施例 7】

【0069】

実施例 3 の実験操作において、T w e e n-20 を加えずに行ったこと以外は実施例 3 と同様の方法で E P O 封入架橋ヒアルロン酸微粒子を調製した。

【実施例 8】

【0070】

実施例 3 の実験操作において、S T T を加えずに行ったこと以外は実施例 3 と同様の方法で E P O 封入架橋ヒアルロン酸微粒子を調製した。

【比較例 1】

【0071】

実施例 1-2 で調製したバッチ 3 の S H 基の導入率が 56 モル%である H A-SH 33 mg を 690  $\mu$  L の 10 mM リン酸バッファ (pH 8.0) に溶かし、30  $\mu$  L の E P O 水溶液 (10 mg/mL) を添加し、10 分攪拌した。これに、S H 基に対して 1 モル倍の Sodium tetrathionate (S T T) 9.3 mg を 30  $\mu$  L の 10 mM リン酸バッファ-pH 8.0 に溶かした溶液を加え、250  $\mu$  L を 1 mL シリンジに詰めて 37°C で 5 時間反応させることで、円柱状の H A ゲルを得た。

【比較例 2】

【0072】

実施例 8 で、H A-SH ではなく H A を使用したこと以外は実施例 8 と同様の方法で E P O 封入 H A 微粒子を調製した。

なお、実施例 1～8 および比較例 2 における各微粒子の回収率は 50%～65%であった。

#### 【試験例 1】

##### 【0073】

粒子径、粒子含水率測定

実施例 3 において調製した微粒子の顕微鏡写真を図 1 に示す (3000 倍)。この微粒子を PBS 中に分散させた時の顕微鏡写真を図 2 に示す (3000 倍)。当該微粒子の乾燥時の粒子径は約  $1.2\mu\text{m}$  であり、水膨潤時の粒子径は約  $1.8\mu\text{m}$  であった。

##### 【0074】

熱重量分析 (TGA) を行い、実施例 3 で製造した微粒子の含水率を測定した (図 3) 含水率は約 15% であった。

#### 【試験例 2】

##### 【0075】

EPO 封入架橋ヒアルロン酸微粒子の EPO 回収率測定

実施例 1～8、比較例 2 の微粒子 5mg を 0.5mL の PBS に分散させ、Hyaluronidase SD (生化学工業製: Hase) 0.25 ユニットを添加、25℃で 3 時間、酵素処理を行い、微粒子を完全に分解させた。また、比較例 1 のゲル (0.25 mL ゲル) に Hyaluronidase SD (生化学工業製) 0.5 ユニットを含む PBS pH 7.4 を 0.75 mL 加え、25℃で 1 日、酵素処理を行い、ゲルを完全に分解させた。酵素処理後の溶液 0.15 mL を、試料溶液とした。試料溶液は、逆相クロマトグラフィー (RP-HPLC) 測定を行い、0.1mg/mL の EPO 水溶液を標準溶液として、標準溶液と試料溶液のピークエリア比から試料溶液中 EPO 濃度を算出した。添加した EPO 量 (0.1mg/ゲル 1 個) に対して RP-HPLC より求めた EPO 量を回収率として算出した。

##### 【0076】

逆相カラムによる高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) 分析は、Waters 600S コントローラ、717plus オートサンプラー、486 赤外光吸収測定器 (Waters 社製) を用い、以下の測定条件で行った。

カラム: C4 (粒子径  $5\mu\text{m}$ 、サイズ  $4.6\times 250\text{mm}$ )

移動相:

A: 水/アセトニトリル/トリフルオロ酢酸 = 400/100/1

B: 水/アセトニトリル/トリフルオロ酢酸 = 100/400/1

流速: 1mL/分、移動相 A/B = 65/35 ~ 0/100 のグラジエント溶出

カラム温度: 室温付近

サンプル温度: 4℃

検出波長: UV 280nm

解析ソフト: Millennium 3.2 ver. 3.21

上記方法で測定された EPO を仕込みに対する回収率は、以下のとおりであった。

実施例 1-4: 90%～95%

実施例 5-6: 80%～85%

実施例 7-8: 75%～80%

比較例 1-2: 90%～95%

STT、界面活性剤を添加することで回収率が改善されることが分かる。

#### 【試験例 3】

##### 【0077】

EPO 封入 HA ヒドロゲル調製からの EPO 徐放

実施例 3 のマイクロヒドロゲル 20mg と比較例 1 のバルクゲル (250  $\mu\text{L}$ ) を 2 mL の PBS 中、37℃でインキュベートし、経時的に 200  $\mu\text{L}$  サンプリングした。RP-HPLC でバッファー中に放出された EPO を定量した。

##### 【0078】

ゲル調製直後にヒアルロニダーゼで分解、回収されたEPOを100%とした時のゲルからのEPO放出性を図1に示す。尚、9日後にヒアルロニダーゼ(HAse)を添加した。

【0079】

ゲル内のEPOは変性せず、比較例1のゲルは、架橋密度が低い為EPOの放出が早く、実施例3のマイクロゲルは架橋密度が高い為、30%程度が5日程度で徐放され、40%のEPOが拡散では放出されずに酵素分解によって初めて放出されることが分かる。

【0080】

上記実施例に例示された、薬物をヒアルロン酸架橋体中に封入した薬物担持微粒子を用いることで、タンパク質またはペプチド等の薬物の生物活性を維持したままこれらを*in situ*架橋、乾燥し、ゲル微粒子の中に封入したタンパク質またはペプチド等を長期間放出するインジェクタブルな薬物徐放製剤を調製することが可能である。

【産業上の利用可能性】

【0081】

本発明の薬物徐放担体は、タンパク質またはペプチド等の薬物の生物活性を維持したままこれらを*in situ*化学架橋、乾燥、HAゲル中に封入でき、優れた回収率でタンパク質、ペプチド等の薬物の長期徐放を可能にするインジェクタブルな微粒子を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0082】

【図1】 架橋HA-SH マイクロハイドロゲル微粒子を顕微鏡で撮影した写真の一例である。

【図2】 PBS中での膨潤後の架橋HA-SH マイクロハイドロゲル微粒子を顕微鏡で撮影した写真の一例である。

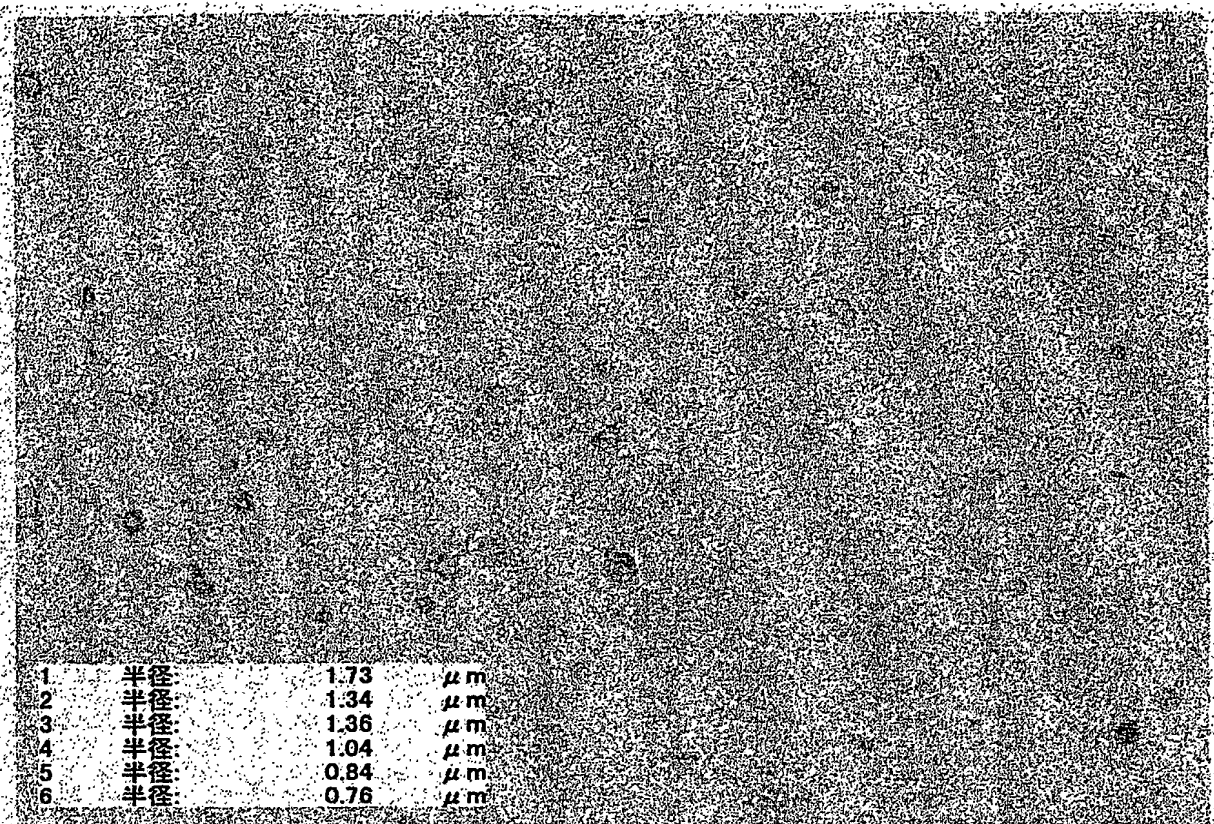
【図3】 EPOを封入した架橋HA-SH マイクロハイドロゲルについて熱重量分析を行った結果の一例である。

【図4】 実施例1-4において得られた架橋HA-SH マイクロハイドロゲル微粒子から回収されたEPOの量を示すRP-HPLC分析の結果の一例を示すグラフであり、下からそれぞれ実施例1、実施例2、実施例3、実施例4で得られて微粒子を示すものである。

【図5】 実施例3と比較例1で得られたHAゲルからのEPOの放出性を示すグラフである。

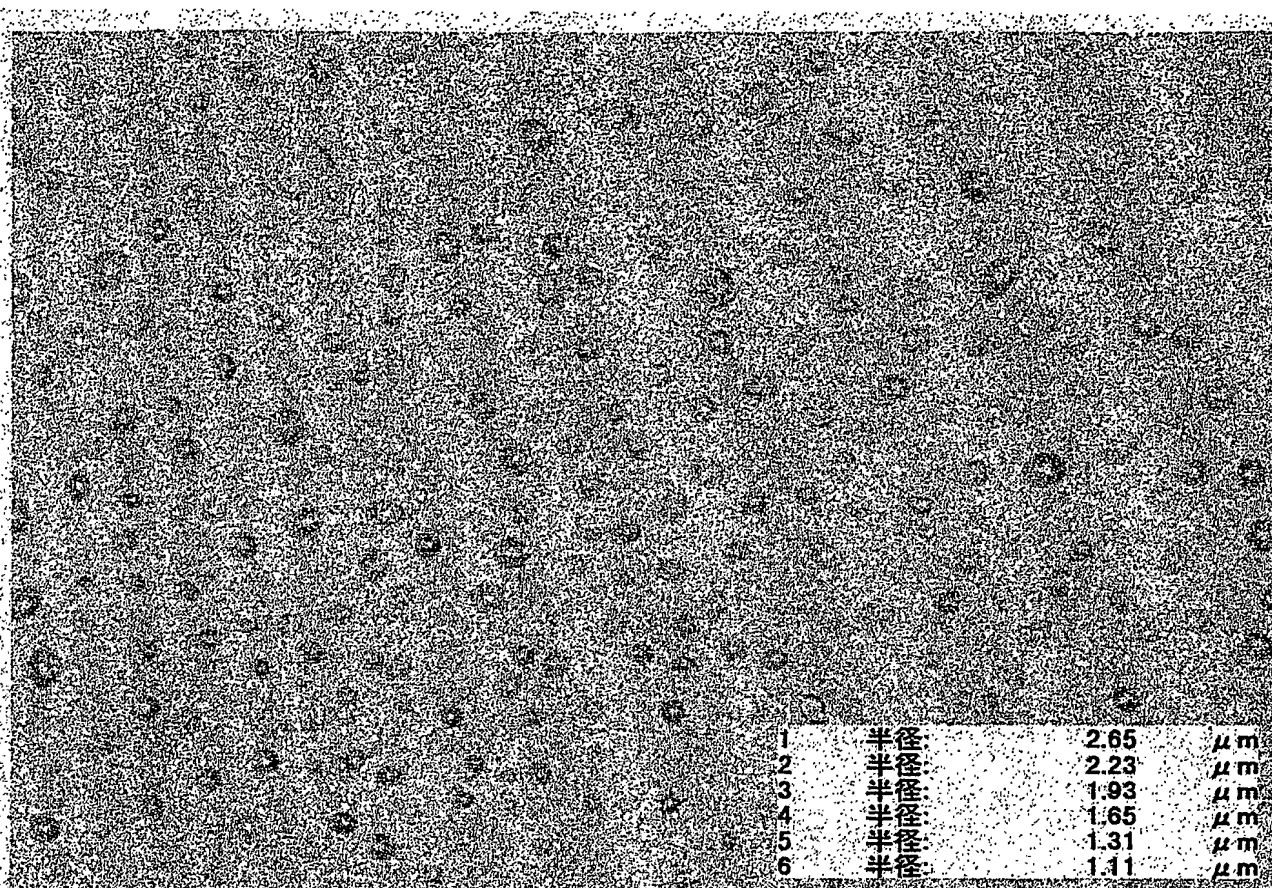
【書類名】 図面

【図 1】



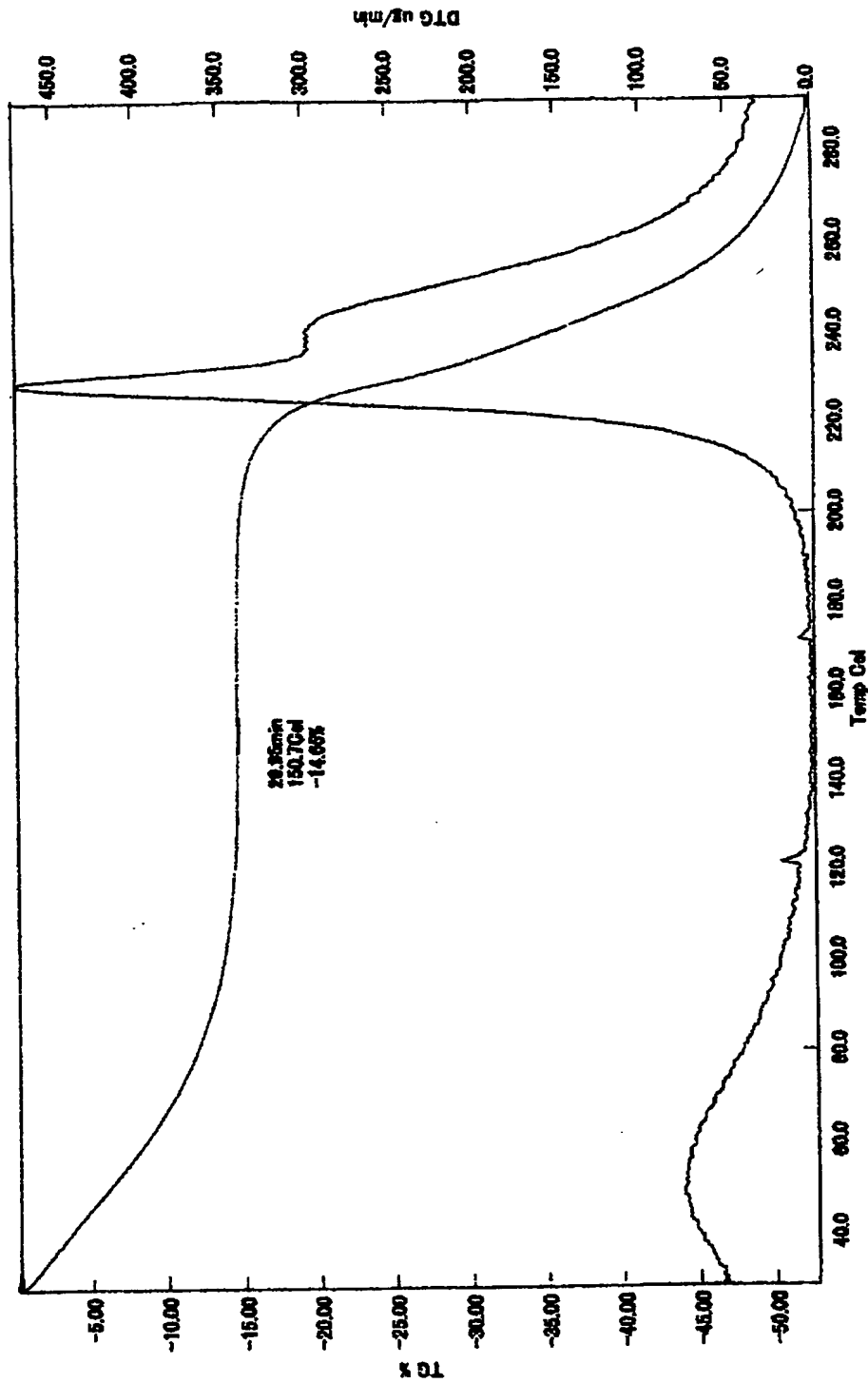
架橋HA-SH マイクロハイドロゲル粉末

【図2】



PBS中での膨潤後の架橋HA-SH マイクロハイドロゲル

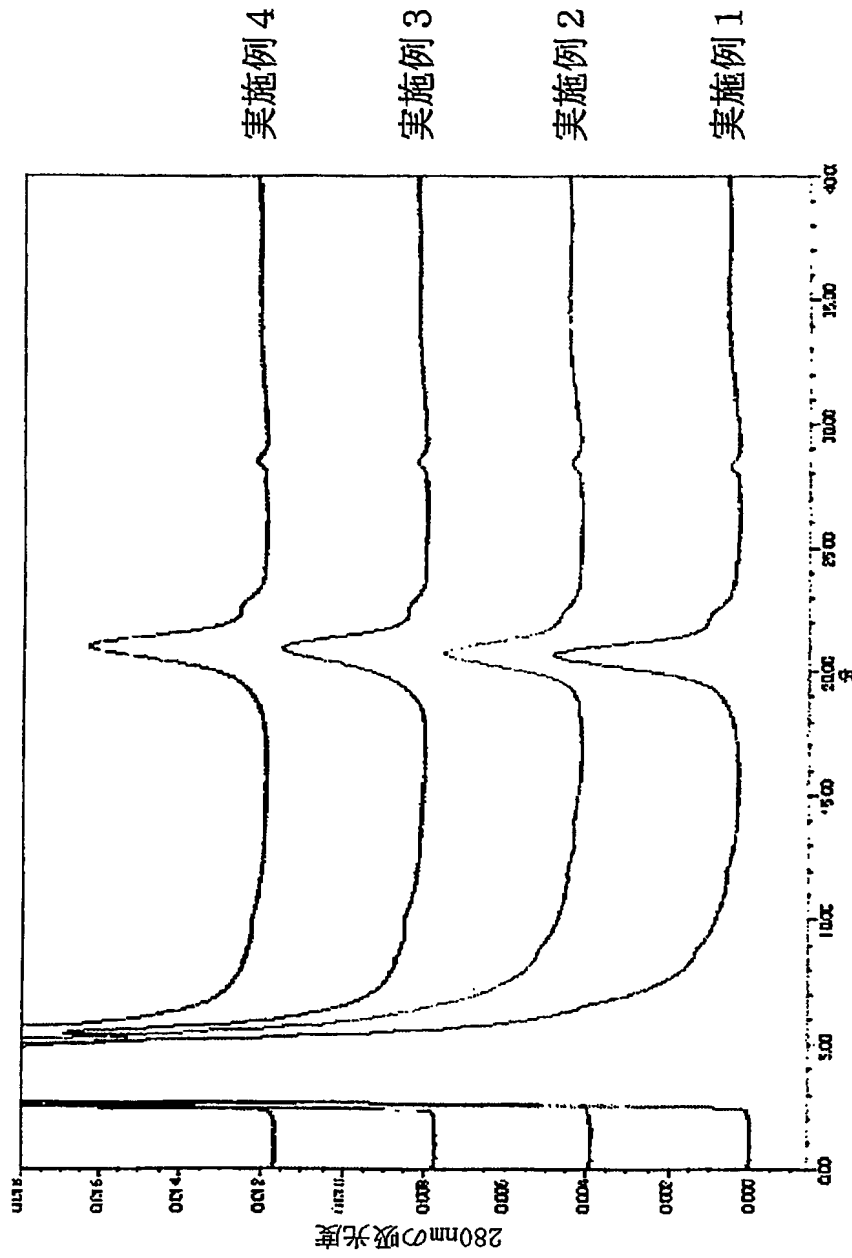
【図 3】



EPOを封入した架橋HA-SH マイクロハイドロゲルの熱重量分析結果

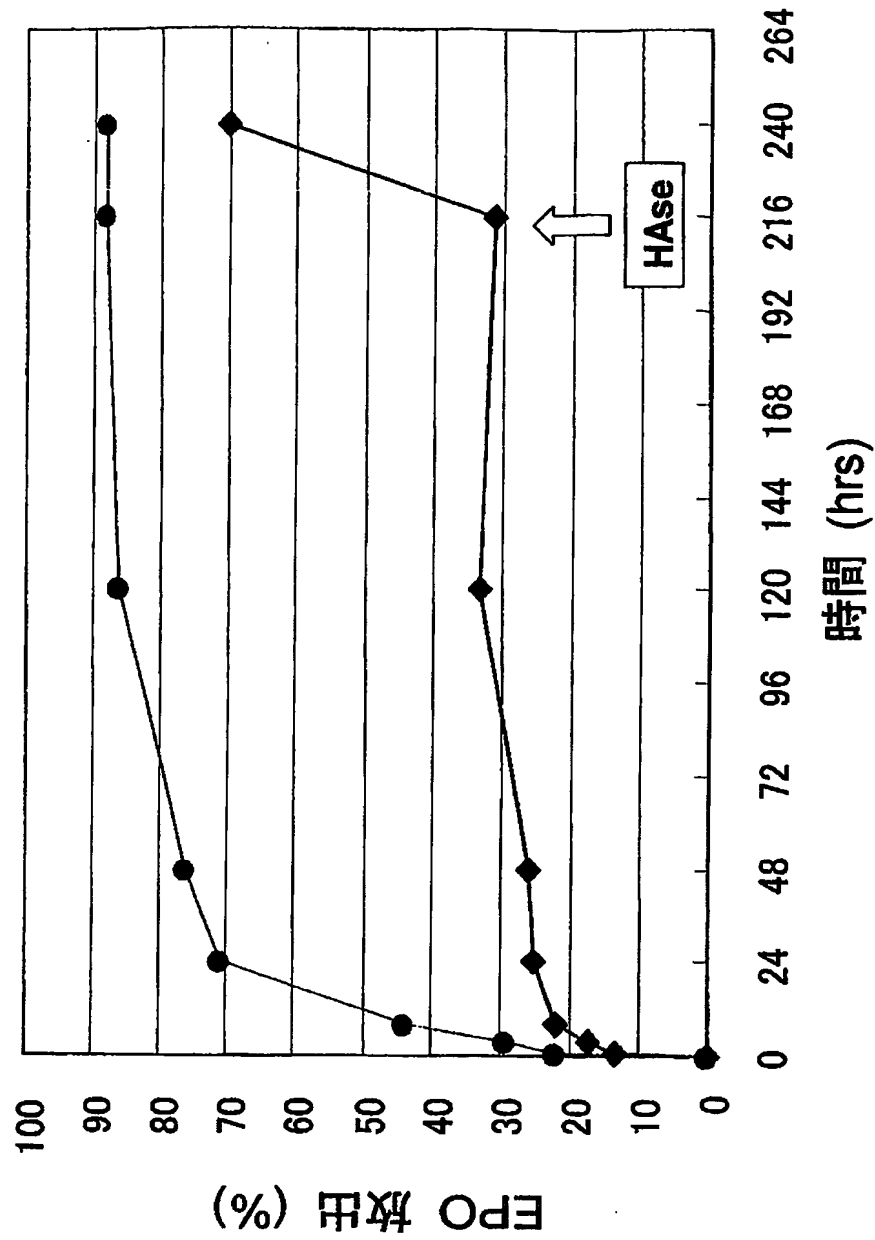


【図4】



架橋HA-SH マイクロハイドロゲルからのEPO回収結果 (RP-HPLC)

【図 5】



HAゲルからのEPOの放出性

## 【書類名】要約書

## 【要約】

【課題】 タンパク質、ペプチド等の薬物の生物活性を阻害せずに高封入率で封入でき、インジェクタブルで、完全に生分解性で安全なタンパク質またはペプチド等の薬物の長期徐放製剤を提供する。

【解決手段】 架橋反応可能な官能基を有するヒアルロン酸などの多糖誘導体またはその塩と薬物との溶液を微粒子状態で架橋反応の進行の遅い希薄な状態から架橋反応が進行する濃度に脱水することで、濃縮中に架橋反応を起こし、薬物を多糖架橋体中に封入した薬物担持微粒子にすることで、タンパク質、ペプチド等の薬物の生物活性を維持したままこれらを効率よく封入、長期間徐放できるインジェクタブルな徐放製剤を実現できる。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 3 8 5 0 5 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 3 3 1 1 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 9 月 5 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号

氏 名

中外製薬株式会社

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/016948

International filing date: 15 November 2004 (15.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2003-385054  
Filing date: 14 November 2003 (14.11.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 20 January 2005 (20.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse